

DETERMINACION CROMATOGRAFICA DE MANITA EN VINOS¹

Pon ROBERTO VEGA, JUAN DE DIOS REGINO MORALES y
EDUARDO OSCAR FLORES "

RESUME

On propose une méthode chromatographique pour la détermination quantitative de manite en utilisant de tres petites quantités de vin de l'ordre de 0,02 ml.

On effectue la détermination qualitative avec une chromatographie monodimensionnelle descendante développée avec l'hydroxide de sodium en alcool.

éthilique, et hydroxide d'ammonium 6 N.

Pour la détermination quantitative on doit développer le témoin, couper le papier et le rincer pour une oxidation périodique postérieure.

On a effectué des essais de récupération et de répétitions sur le meme-échantillon pour faire l'analyse statistique.

On peut diminuer l'erreur déterminé en augmentant l'échantillon.

On détermine que la sensibilité de la méthode peut être augmentée avec la quantité de l'échantillon.

On indique quelques précautions à prendre dans le développement et la titlation; finalement on a établi la façon d'identifier la manite de la sorbite qui ont la meme valeur de Rf.

1. INTRODUCCION

La mayor parte de los autores e investigadores (1, 2, 3, 4) están de acuerdo en que la presencia de la manita en los vinos y mostos es siempre anormal, y su origen sería debido a la acción de bacterias lácticas en las podredumbres y cuando las temperaturas de fermentación son elevadas, superando los 35°C y siendo la acidez de los mostos pobre, dando así lugar a la enfermedad conocida con el nombre de agri-dulce, debido a la presencia de manitol, que tiene sabor dulce, y del acético en cierta concentración.

Sin embargo EMILIANI, en nuestro país, en su trabajo de investigación (5) llega a la conclusión de que el manitol es un constituyente normal del jugo de la uva en proporción de 1 a 4 mg / 100

¹ Trabajo realizado en el Instituto del Vino de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. Presentando para su publicación el 5 de

abril de 1968.

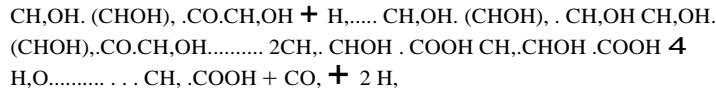
² Profesor Titular, Profesor Adjunto y Jefe de Trabajos Prácticos de Enología I, respectivamente. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

pudiendo aumentar la cantidad presente en el vino por la fermentación espontánea de ciertos lactobacilos heterofermentativos.

GAROGGIO (3) dice que si un vino manítico se presenta alterado químicamente y en sus caracteres organolépticos, debe presumirse que se debe a fermentaciones anormales, en cambio si el vino se presenta normal, debe sospecharse el corte con ciertos vinos de fruta especialmente de higos.

El mismo autor menciona que al ser atacados los azúcares, aún no fermentados, se produce de preferencia manita que es acompañada de pequeñas cantidades de alcohol, ácido acético, láctico, CO, etc.

La acción bioquímica de los gérmenes generadores de esta enfer-. medad es muy compleja, considerándose (3) que la misma se verifica sobre la levulosa para dar manita y otros compuestos: ácido láctico, y acético, de acuerdo a las siguientes reacciones:



Independientemente sería la acción sobre la glucosa, dando lugar a la formación de alcohol, ácido acético, glicerina y CO. Las concentraciones de manita (2) encontrada en los vinos, son muy variables, desde menos de 1 gramo hasta 25 y 30 gramos por litro.

Sin embargo RIBEREAU GAYÓN (4) asigna también otro origen, además del mencionado, a la manita, indicando que bajo ciertas condiciones *Botrytis cinerea* produce este alcohol a partir de glucosa.

PROPIEDADES

El manitol o d-manita es un alcohol exavalente, de fórmula CH₄O, de peso molecular 182.17 de sabor dulce, funde a 166°C, y a temperatura mayor se descompone. Discretamente soluble en agua fría, muy soluble en agua caliente, muy poco soluble en alcohol, insoluble en éter, su desviación es de: 13° 1,52. Forma cristales agujiformes fig. 1 y 2. (Formación típica en el extracto de un vino manítico.)

Los métodos que han sido propuestos para la identificación y -dosaje de este alcohol se pueden agrupar de la siguiente manera:

a) Cualitativos, basados en:

1. La evaporación de cierta cantidad del líquido problema en vidrio de reloj y consecuente formación de cristales de forma característica (aciculares).

b) Cuantitativos, basados en:

1. La concentración del líquido, cristalización de la manita, extracción con alcohol, etc. y pesado.
2. La extracción y oxidación con ácido periódico.
3. La exaltación del poder rotatorio por adición de molibdato.
4. La exaltación del poder rotatorio por el ácido arsenioso en medio alcalino.
5. La decoloración por carbón, concentración pasando por columnas de intercambio aniónico y catiónico, absorción en trozos de papel de filtro, separación por colector y aplicación de cromatografía, comparación con testigos.

En el presente trabajo se describe un método cromatográfico para la determinación del manitol, a partir de pequeñas cantidades de muestras de vino, sin tratamiento previo, posterior lavado de este alcohol y dosaje mediante el ácido periódico.

II. OBJETIVO

Hemos tenido oportunidad de constatar en ciertos vinos, que daban desviación polarimétrica positiva, a los cuales se les sospechaba de adulterados, que la misma se debía a la presencia de cierta cantidad de manita, que no era detectada por los procedimientos comunes.

La desviación positiva anormal, se atribuía a los restos de glucosa no fermentada aumentada por la desviación positiva, aunque pequeña, de la manita.

Esta situación nos llevó a estudiar los distintos métodos existentes y finalmente a proponer uno por cromatografía; el que se detalla en el presente trabajo.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1) Materiales y reactivos utilizados.

- a) Papel: hemos utilizado papel de filtro Whatman IN? I, cortado en bandas de 9 cm de ancho por 47 cm de largo. Cada banda se marca a lo largo con trazos de lápiz, de manera de dividirla en dos secciones de igual ancho, luego a 8,5 cm de uno de los extremos se traza una perpendicular a la anterior, en esta línea y en el medio de cada tira se traza un círculo de 0.5 cm de diámetro donde se colocará la muestra del vino tal cual y del testigo.
- b) Para la colocación de la muestra usamos micro-pipetas de 0,1 ml de capacidad, aguzado en el extremo inferior.



e) Recipientes cromatográficos.

Nos ha resultado práctico usar como recipiente el sistema formado por un desecador de 25 cm de diámetro interno y una campana de vidrio del mismo, diámetro aproximadamente, similar al propuesto por PALLERONI y VEGA ().

En el interior de la cámara se coloca una probeta o columna de vidrio de aproximadamente 50 cm de altura sobre la que se apoya una caja de Petri común de 15 cm de diámetro que es la que lleva el solvente; en ella se coloca un soporte construido con varilla de vidrio doblado a la llama, que mantiene la posición de la banda de papel.

d) Solvente.

Como solvente se usa la mezcla de butanol-piridina-agua (43: 42: 15).

e) Reveladores.

1. Solución de nitrato de plata.

Preparada de la siguiente manera: a 20 ml de acetona se le agrega 0,1 ml de solución de nitrato de plata saturado en agua. Se observa si se forman unos cristales, en caso afirmativo se agregan unas gotas de agua para redisolverlos.

2. Solución 0,5 N de hidróxido de sodio en alcohol etílico.

3. Solución de hidróxido de amonio 6N. 4. Acido

sulfhídrico

f) Pulverizador.

Se han usado pulverizadores, para uso cromatográfico, totalmente contruidos en vidrio.

g) Cubetas.

Se han utilizado cubetas de material plástico .

h) Secado.

Se utiliza corriente de aire caliente (secador de cabello de mano) .

i) Soluciones para el dosaje.

Las soluciones que se utilizan en la determinación cuantitativa son:

I) Solución de ácido periódico $N/200$.

Se prepara disolviendo 0,575 g de periodato de potasio en unos 600 ml de agua destilada, conteniendo 3 ml de: ácido sulfúrico concentrado; se calienta en baño maría y se agita hasta disolución, luego se lleva a 1000 ml.

II) Solución de ácido arsenioso N/100.

Se pesan exactamente 0,4948 g de anhídrido arsenioso pro-análisis, conservado previamente en desecador con, cloruro de calcio, y se disuelven en matraz aforado de 1000 ml conteniendo aproximadamente 500 ml de agua destilada, adicionada de 0,400 g de hidróxido de sodio, calentado suavemente a baño de maría. Se agregan dos gotas de fenolftaleína, en solución alcohólica a-1 1 % y se agrega ácido sulfúrico al 10 % hasta desaparición del color del indicador. A parte y en unos 400 ml de agua, se disuelven 2g de bicarbonato de sodio y se agrega a la solución anterior, decolorando nuevamente con sulfúrico, si aparece el color del indicador, y se completa con agua destilada hasta el enrase.

III) Solución de iodo N/200.

Se llevan a matraz aforado de 1000 ml 0,635 g de iodo y 127 g de ioduro de potasio, se disuelven con la menor cantidad posible de agua, luego se enrasa a 1000.

IV) Solución de bicarbonato de sodio al 8 %.

V) Solución de ioduro de potasio al 10 %.

VI) Solución de almidón soluble al 2%.

2) Descripción del método.

a) Obtención de los cromatogramas.

Cortado el papel en la forma indicada, es de 9 X 47 cm, dividido longitudinalmente en dos tiras iguales y practicado a 8,5 cm el trazo perpendicular y el círculo correspondiente a cada una, se colocan las muestras del testigo de manita al 4 % y del vino problema, sin ningún tratamiento, mediante micropipeta y en cantidad de 0,02 ml.

A medida que se va colocando la muestra, se va secando mediante aire caliente producido por el secador de cabello.. Se colocan las bandas en la cámara ubicando parte del solvente en la caja de Petri que está sobre la probeta de donde pescan las mismas; por lo tanto esta cromatografía es descendente, otra fracción se coloca en la parte inferior con el fin de saturar el ambiente de la cámara.

Los tiempos durante los cuales se debe dejar correr el solvente en la banda para una buena separación, son variables, dependiendo fundamentalmente de la temperatura. Después de muchos ensayos, hemos obtenido resultados satisfactorios con 44 horas, a temperatura ambiente, que oscilaba entre 20 y 24°C.

Luego de transcurrir el tiempo mencionado, se sacan las bandas, se dejan secar libremente, durante unas 2 horas, luego se hace la revelación de acuerdo a la técnica de TREVELYAN (7) consistente en pulverizar con la solución de nitrato de plata:



en acetona y una vez seco el papel con la solución de hidróxido de sodio 0.5 N en alcohol etílico.

Nos ha dado muy buenos resultados el reemplazar la pulve. rización por una inmersión rápida, en cubetas de material plástico conteniendo las soluciones antes mencionadas.

Si se desea fijar la mancha o sea obtener cromatogramas definitivos, se lava la tira en hidróxido de amonio 6N durante unos pocos segundos, y posteriormente en agua corriente durante media hora, se seca y aún húmedo el papel, se le expone a vapores de ácido sulfhídrico con lo que la plata que allí se encuentra, se convierte en un sulfuro de plata de color negro, que detecta el compuesto investigado.

Si el problema a resolver es solo cualitativo se revela la banda completa, es decir el testigo ele manita pura y el del vino problema.

Si es cuantitativo se colocan dos muestras del mismo vino en las tiras que forman la banda, después del secado posterior al corrido del solvente, se corta por el trazo central. revelándose una de las tiras, y colocadas paralelamente se marca el lugar de ubicación de la manita en la otra tira la que se dedicará al análisis.

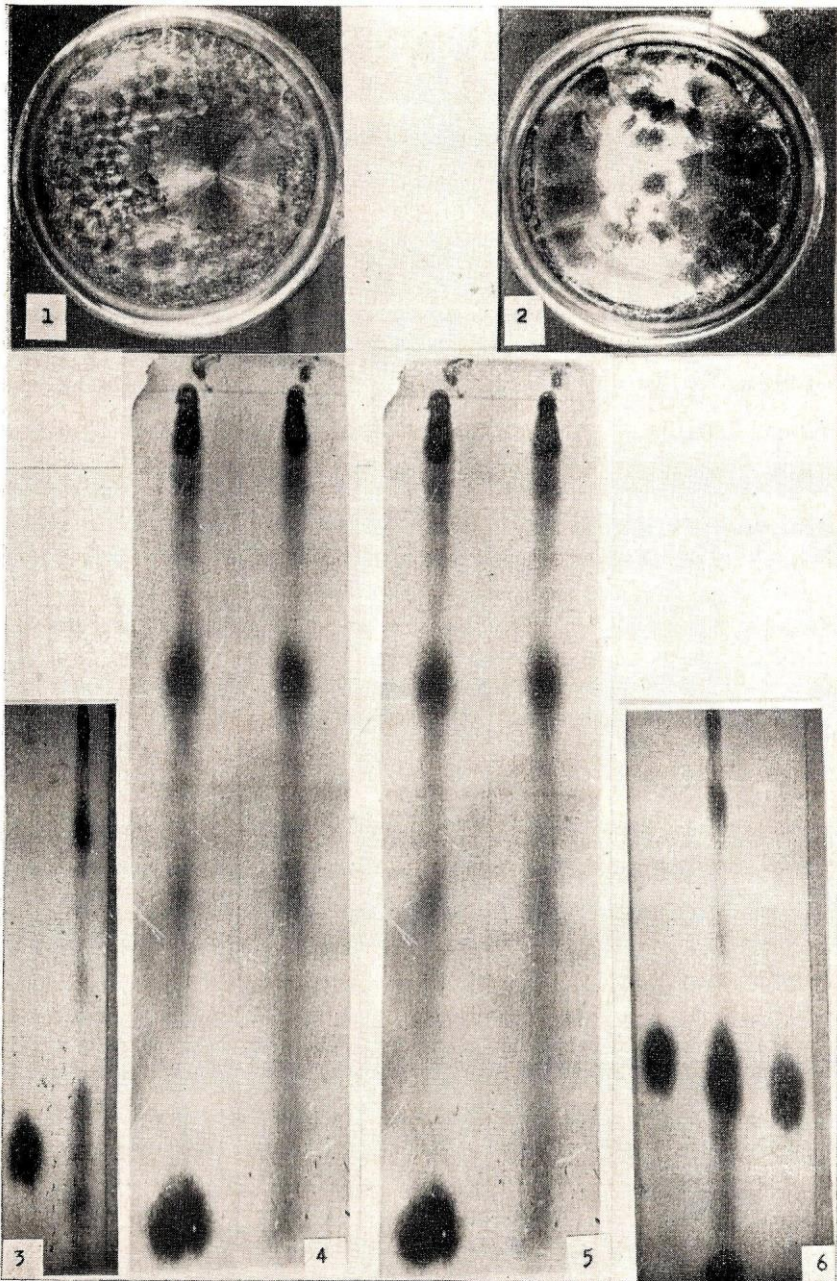
En el problema en que hemos estado empeñados en resolver no nos ha interesado la obtención de coeficientes Rf.. en razón de que con la división de la banda de papel en dos tiras de igual ancho, en una de las cuales va la muestra testigo de solución pura y en la otra el vino, o en ambas al mismo vino, una de las tiras revelada indica la posición de la mancha permitiendo realizar el análisis con la otra.

b) Procedimiento analítico y cálculos.

Una vez realizada la revelación se pone ésta paralelamente con la correspondiente no revelada, se marcan con un trazo de lápiz los límites superior e inferior de la mancha con un pequeño margen de seguridad en esta última. Se corta con tijera y se coloca en Erlenmeyer de 250 ml .

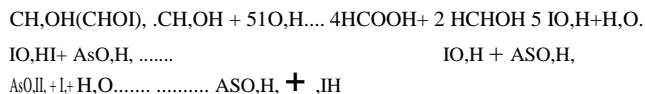
Se realiza la misma operación con un trozo de papel del mismo tamaño y cortado a igual altura, de una tira donde ha corrido el solvente, sin contener muestra a fin de que sirva de testigo.

A los Erlenmeyers se les agrega 50 ml de agua caliente, entre 65° 70°C y se deja 30 minutos agitando de cuando en cuando, se agregan 10 ml de periódico N/200. 5 ml de bicarbonato al 8.se deja en reposo 20 minutos, luego se agregan 20 ml de arsenioso N/100, 1 ml de ioduro de potasio al 10 %. 1ml de almidón al 2%,se deja en reposo 10 minutos y se titula con iodo N/200.



Los cálculos se basan en las reacciones entre manita y ácido, periódico, ácido periódico y ácido arsenioso, y ácido arsenioso y iodo; que ocurran en este orden durante la marcha analítica.

Las reacciones son las siguientes:



De esta ecuación se desprende que:

- a.) 1 mol de manita equivale a 5 moles de ácido periódico.
- b) 1 mol de ácido periódico equivale a 1 mol de ácido arsenioso.
- c) 1 mol de ácido arsenioso equivale a 1 mol de I₂.

Por lo tanto 36.43 de manita corresponden a 253,84 grs de I₂. Teniendo en cuenta lo que antecede, los cálculos se realizan de la manera siguiente:

Factor de la solución de iodo: si el título de la solución de iodo fuera exactamente N/200. habríamos gastado 20 ml de la misma para 10 ml de ácido arsenioso N/100, es decir 0,127 gr de iodo que corresponden según las relaciones expresadas anteriormente a 0.0018 gr de manita.

Como el título de la solución varía, se gasta una cantidad distinta de 20 ml. pero de cualquier manera, ésta se ajusta con la solución de ácido arsenioso, donde en el volumen gastado están contenidos los 0,0127 gramos de iodo.

Si el consumo de iodo para 10 ml de arsenioso N/100 ha sido por ejemplo de 21,4 ml de iodo N/200, el factor se encontrará dividiendo 0.0018 por 214, es decir será de 0,000084, así si en la prueba en blanco hemos gastado 11,6 ml y en el ensayo un vino con manita 12.1 ml usando 0,02 ml de muestra, el contenido se obtiene multiplicando la diferencia entre el ensayo en blanco y lo gastado en la determinación por el factor y éste llevándolo a litro, así:

$$\begin{aligned} 0.5 \quad 0,000084 &= 0.000042 \\ 0,000042 \quad 50000 &= 2.100 \text{ gr } \%/a \end{aligned}$$

e) Resultados obtenidos:

I. Resultados cualitativos:

Se han desarrollado cromatogramas colocando en una tira de papel solución pura al 4 % como muestra de referencia y otra de vino con manita pudiendo apreciarse la ubicación de: la mancha sin ninguna interferencia. Fig. 3.

Igualmente se ha realizado un cromatograma empleando como muestra vinos sin y con agregado de manita. Fig. 4.

También una banda de 3 tiras o secciones con manita pura, vino con manita y el mismo vino sin adición de manita, pudiendo apreciarse la ubicación de la mancha en la muestra de solución pura y vino en la misma ubicación y la ausencia de mancha en el vino sin manita. Fig. 5.

Siendo la manita un exalcohol y la sorbita su isomero, que se encuentra naturalmente en el vino en pequeña cantidad, hemos realizado cromatogramas con el objeto de determinar la interferencia de esta última, constatándose en el presente caso que la ubicación es la misma.

En su realización se han empleado soluciones puras de manita y sorbita y de vino adicionado de manita en concentraciones de 4 g por litro. Fig. 6. Como advertíamos anteriormente no nos ha interesado determinar el Rf.

II. Resultados cuantitativos.

1) Recuperación de manita:

Se han hecho los ensayos correspondientes a la recuperación de la manita, considerándose conveniente hacerlo sobre un vino y no en soluciones puras, por tratarse el primero de un líquido complejo donde pueden interferir en la cromatografía y posterior dosaje numerosos constituyentes.

Para ello se tomó un vino tinto, en el cual se dosó previamente el contenido de sorbita, dado que ésta se ubica en la misma posición de la manita, siguiendo la técnica de LITTELSCHIED modificada por TARÁTOLA (8), dando como resultado 136 mg por litro. Al mismo se le agregaron 4 g $\frac{3}{40}$ de manita. Se realizó la cromatografía y dosaje, siguiendo la técnica ya descrita en diez determinaciones con los siguientes resultados.

| | | |
|----|----------------------|--------|
| | Determinación | 4,250. |
| 2 | » | 4,750 |
| 3 | | 4,720 |
|)) | » | 4,250 |
| | » | 3,780 |
| 6 | » | 4,250 |
| | » | 3,780 |
| 7 | » | 4,250 |
| | | — |
| 8 | » | 4/72 |
| | Promedio | 0 |
| 9 | | 4,25 |

A este promedio hay que restar 0.136 g correspondiente al contenido de sorbita, por lo tanto el dosaje de manita en

promedio en las 10 determinaciones 4,161, con 161 mg en exceso lo que represen tan sólo el 4% de error:

Se ha aplicado el análisis estadístico a las determinaciones, 1:n teriores con el Eiguiente resultado:

| Detrm. | X | Mx | d1 | d' | S, |
|----------|---------------|-------|--------|---------------|---------|
| | 4,250 | | -0,050 | 0,0015 | |
| - | 4,750 | | -0,450 | 0,2025 | |
| > | 4,720 | | +0,420 | 0,1764 | |
| 4 | 4,250 | | -0,050 | 0,0025 | |
| o) | 3,780 | 4,300 | -0,520 | 0,2704 | 0,3509, |
| " | 4,250 | | -0,050 | 0,0025 | |
| 7 | 3,780 | | -0,520 | 0,2704 | |
| 8 | 4,250 | | -0,050 | 0,0025 | |
| 1.00. | 4,720 | | +0,420 | 0,174 | |
| IU | 4,250 | | -0,050 | 0,0025 | |
| | <u>43,000</u> | | | <u>1,1086</u> | |

Media aritmética $Mx = 4,300$
 Desviación standard..... $Sr = 0,3509$
 Coeficiente de variación $\frac{S}{Mx} \times 100 = 8,16 \%$
 Desviación standard de la media ... $\frac{S}{\sqrt{N}} = 0,111/$
 Coeficiente de variación de la media. $\frac{S}{\bar{X}} \times 100 = 2,58 \%$

2) Dosaje en vmos.

Se ha efectuado el dosaje en ocho muestras de vmo con los siguientes resultados:

| Muestra No | Resultados | grs. %/a de manita |
|------------|------------|--------------------|
| No 1 | 3,53- | |
| » No 2 | 4,422 | » |
| » No 3 | 6,191 | » |
| » No 4 | 7,518 | » |
| » No 5 | 9,287 | » |
| » No 6 | 11,94 | » |
| » No 7 | 0,884 | » |
| » No 8 | 0,663 | » |

Hacemos notar que en las determinaciones es necesario, tener en cuenta ciertas, precauciones tanto en el revelado, como en el dosaje.

En el revelado debe dejarse secar bien el papel sacado de las cámaras antes de aplicar el nitrato de plata y luego lo mismo para la aplicación del hidróxido de sodio. Mientras más tiempo transcurra entre una y otra aplicación (más seco) más nítida es la mancha de manita y persiste por más tiempo.

Durante la titulación con iodo N/200 es necesario tener especial cuidado en el punto de viraje, color azulado, igualando dicho color en el testigo y las muestras problemáticas.

d) Sensibilidad del método:

Para la determinación de la sensibilidad del método se han preparado soluciones con cantidades variables de manita colorado en el papel 0,02 ml de ésta, efectuando el desarrollo del cromatograma y dosaje en la forma descripta. De dichos ensayos, se desprende que para tal cantidad de muestra se puede apreciar hasta una gama de manita, lo que significa 50 mg/litro con 0,5 de gama la apreciación es dudosa.

Aumentando la cantidad de muestra, se puede llegar a una sensibilidad mayor, que no es necesaria a los fines prácticos.

e) Interferencia de la sorbita:

La interferencia provocada por la sorbita es de relativa importancia debido a su pobre contenido en vinos normales, pues no supera los 120 mg/litro. Cantidad que sólo puede ser sobrepasada con el agregado de sidra. Si se sospecha de tal situación se puede recurrir a dos medios distintos que son:

I Separación mediante la técnica cromatográfica propuesta por EMIA y colaboradores () por tratamiento del papel con molibdato de amonio debiendo concentrarse la muestra, decolorarse, pasarse por columnas aniónicas y catiónicas, etc.

II. Constatación si efectivamente la sustancia de la mancha corresponde a manita.

Para ello se trabaja, utilizando la técnica propuesta con la única variante de aumentar la muestra a 0,1 ml. Una vez hecha la revelación en el testigo se corta el trozo de papel correspondiente, se hierve dos veces con 50 ml de agua durante 10 minutos, se filtra en caliente para eliminar las fibras de papel, se reúne el filtrado en vaso de precipitación y se evapora reduciendo el volumen a unos 3 ml, se pasa luego a vidrio reloj que se coloca en baño maría, se enjuaga el vaso, teniendo especial cuidado de que el líquido en el vidrio reloj no tenga un diámetro mayor de 3 cm y que no se evapore completamente. Después se lleva a estufa a 25°C con el objeto de proceder a una evaporación final a baja temperatura. A las 48 horas, ya se insinúan cristales de ma



nita y a los 8 a 10 días no queda ninguna duda pues los. mismos son netos, evidenciando claramente la presencia de este polialcohol.

2.

IV. RESUMEN

Se propone un método cromatográfico para la determinación cuantitativa de manita en vinos, de especial aplicación cuando ésta se encuentra en pequeña cantidad.

El mismo constituye un micrométodo pues se parte de un vino. sin tratamiento alguno, en cantidad de 0,2 ml.

Se basa en la cromatografía monodimensional descendente y revelación con hidróxido de sodio en alcohol etílico e hidróxido de amonio *6N para su determinación cualitativa. Para la cuantitativa revelación del testigo, corte del papel y lavado del mismo para realizar una posterior oxidación periódica.*

Se efectúan ensayos de recuperación, así como también repeticiones sobre una misma muestra sobre la que se aplica el análisis.

esta dístico.

El error determinado puede disminuirse con el aumento de la muestra.

Se determina la sensibilidad del método, que puede aumentarse con la cantidad de la muestra.

Se indican algunas precauciones tanto en el revelado como en la titulación y finalmente se establece la forma de diferenciar la manita de la sorbita pues ambas tienen el mismo Rf.

V. BIBLIOGRAFIA

- 1 RIERSAU-GAYON, J. PEYNAUD, E.: "Traité d'Oenologie". Francia 1960.
- 2 -- "Análisis de vinos". España 1962.
- 3 GAROGLIO, P. G.: "La Nuova Enologia". Italia 1963. 4
- RENOUIL, Y.: "Dictionaire du vin". Bordeaux 1962.
5. EMILIANI, E., UCHA DE DAVIE, I.: "Los polialcoholes del vino, método cromatográfico para revelar el agregado de sidra". Revista de la Facultad de Ingeniera Química, Universidad Nacional del Litoral. Tomo XXVIII. 1959.
- 6 PALLERONI, N. G. y VECA, R.: "Determinación de Glicerina en vinos por cromatografía de papel. Boletín Técnico n° 5 y 6. Facultad de Ciencias. Agrarias. 1954.
- 7 TEELYAN, W E. FOCTER y J. S. HARRISO: "Nature" 166: 444, 1950.
8. TALAOLA, C.: "Rivisti di Viticoltura e Enologia", 11 9-10. 1948. Conegliano.